

(19)

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02142486 A**

(43) Date of publication of application: **31.05.90**

(51) Int. Cl

C12P 7/64
/(C12P 7/64 , C12R 1:645)

(21) Application number: **63297283**

(22) Date of filing: **25.11.88**

(71) Applicant: **LION CORP**

(72) Inventor: **SOMEYA KEITA**
WATANABE YOSHIHIRO
TOTANI EISEI

**(54) PRODUCTION OF UNSATURATED FATTY
ACID-CONTAINING LIPID**

(57) Abstract:

PURPOSE: To form microbial cells into a particular or granular shape, reduce tackiness, facilitate oxygen feed and obtain the subject lipid in high yield by keeping a carbon source in a culture medium in a low concentration and applying a physical stress thereto in culturing a mold.

CONSTITUTION: A microorganism (e.g., *Mortierella alpina*.ATCC32221), belonging to the genus *Mortierella* and capable of producing unsaturated fatty acids is cultured using a carbon source as a restriction substrate

and/or cultured in a liquid culture medium under conditions of, e.g., pH4-7 and 20-30°C for 2-30 days, while applying $\approx 5\text{kg/m}^2\cdot\text{sec}$ physical stress to afford the objective lipid.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

訂正有り

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-142486

⑬ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)5月31日

C 12 P 7/64
//C 12 P 7/64
C 12 R 1:645)

6926-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 不飽和脂肪酸含有脂質の製造方法

⑯ 特 願 昭63-297283

⑰ 出 願 昭63(1988)11月25日

⑱ 発 明 者	染 矢	慶 太	東京都墨田区本所1丁目3番7号	ライオン株式会社内
⑲ 発 明 者	渡 辺	良 弘	東京都墨田区本所1丁目3番7号	ライオン株式会社内
⑳ 発 明 者	戸 谷	永 生	東京都墨田区本所1丁目3番7号	ライオン株式会社内
㉑ 出 願 人	ライオン株式会社			東京都墨田区本所1丁目3番7号
㉒ 代 理 人	弁理士 中 村 稔			外7名

明 細 書

1. 発明の名称 不飽和脂肪酸含有脂質の製造方法

2. 特許請求の範囲

モルティエラ属に属し、不飽和脂肪酸を産生する微生物を、物理的ストレスを与えながら液体培地中で培養して不飽和脂肪酸含有脂質を製造する方法において、

(1) 炭素源を制限基質として培養する、及び／又は

(2) 物理的ストレスが $5 \text{ Kg/m}^2 \cdot \text{sec}$ 以上である

事の特徴とする不飽和脂肪酸含有脂質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は菌体内において目的とする不飽和脂肪酸の生産性を向上すると共にバルブ状に増殖する糸状菌を粒状に制御して培養し、培養中または後処理工程において生産物の取扱いを容易にする不飽和脂肪酸含有脂質の製造方法に関するものである。

〔従来の技術〕

バルブ状に増殖する糸状菌は、培養の進行につれて発酵槽内の器壁、センサー周囲等に付着したり、培養槽上部に固りを形成したりする。その結果、培養液粘度が高まり攪拌不可能となったり、酸素供給が不十分となったりして、糸状菌の生産する目的物質の収率が上がらないという問題がある。

上記問題を改善するため、ウレタンフォームにペニシリン生産菌を植え付け、流動層タイプのタンクの中で培養する方法が提案されているが、流動層タンクは、その体積に比して目的物の生産性

が低いという問題がある。(昭和62年1月30日理研シンポジウム“分離型反応器”講演要旨集 p. 1~4: 遠藤勲著、生物反応プロセスシステムハンドブック(1985)サイエンスフォーラム社)。

また、糸状菌の固体培養法の欠点である培地温度や水分の均一な制御を改善するため、小麦藁を用いた流動層培養法も提案されているが、装置が巨大になり、汎用性が低いという問題がある(化学工学49、349-351(1985))。

一方、糸状菌の形態制御には孢子接種量、界面活性剤添加、粘度が関与する場合があるとの報告があるが、必ずしも顕著な効果は認められない

(総合技術資料集 p 249~258、カビ応用開発研究会企画、テクノアイ出版部出版、1985年7月20日発行)。

〔発明が解決しようとする課題〕

したがって本発明の目的は、糸状菌を培養するにあたり、菌体を粒状にし、結着性を低下させて、攪拌を均一に行い、酸素供給を容易にすることに

よって、目的物質の収率を向上させることができる方法を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者は、上記目的を達成するために鋭意研究を行った結果、不飽和脂肪酸を産生する糸状菌の液体培養時に培地中での炭素源を一定の範囲の低い濃度で連続的に維持する、あるいは、液体培養時に糸状菌に対して物理的ストレスを与えること、もしくは、それらの組合せにより目的物である不飽和脂肪酸の含有率が向上し、同時に菌体がパルプ状から粒状、顆粒状へと、その形態を変えて増殖することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、モルティエラ属に属し、不飽和脂肪酸を産生する微生物を、物理的ストレスを与えながら液体培地中で培養して不飽和脂肪酸含有脂質を製造する方法において、

- (1) 炭素源を制限基質として培養する、及び／又は
- (2) 物理的ストレスが $5 \text{ Kg/m}^2 \cdot \text{sec}$ 以上である

事の特徴とする不飽和脂肪酸含有脂質の製造方法である。

本発明の培養方法は、穏やかな液体培養条件下ではパルプ状に増殖する糸状菌の培養に最も好適に利用される。このような糸状菌としては、例えば不飽和脂肪酸生産性の下記の菌が挙げられる。

モルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina)
IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430

モルティエラ・バイニエリ

(Mortierella bainieri) IFO 8569

モルティエラ・エロンガタ

(Mortierella elongata) IFO 8570

モルティエラ・エクシグア

(Mortierella exigua) IFO 8571

モルティエラ・ミニスティッシマ

(Mortierella minutissima) IFO 8573

モルティエラ・ヴェーティシラタ

(Mortierella verticillata) IFO 8575

モルティエラ・ハイグロフィラ

(Mortierella hygrophila) IFO 5941

モルティエラ・ポリセファラ

(Mortierella polycephala) IFO 6335

これらの菌は、いずれも財団法人臨研研究所(IFO)、若しくは米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection, ATCC)の菌株目録に記載されている糸状菌であり、当業者が容易に入手するものである。

本発明では、これらの糸状菌を通常の液体培地に接種する。液体培地の成分としては、単糖類、多糖類などの炭素源、例えばグルコース、フルクトース、サッカロース、糖蜜、木材糖化液、デンプン水解物などが使用される。このほか窒素源、無機塩など、通常微生物の培養に使用されるものを添加してもよい。例えば、培地中の窒素源としてはアンモニア、アンモニウム塩、グルタミン酸、アスパラギン酸、尿素、動植物由来のペプトン類等を挙げることができ、これらを適宜組み合わせ、さらに必要に応じてカリウム、ナトリウム、鉄、マグネシウム、亜鉛、銅、マンガン等の無機塩、

ビタミン等を添加して使用することができる。好ましい培地としては、ジャガイモ、麦芽、ペプトン、酵母エキス、コーン・スティープ・リカー、カザミノ酸、等を単独に、又はそれらを組み合わせ、必要に応じてさらに糖類を添加して調製した培地を挙げることができ、特に好ましい培地としては、蜜、ジャガイモ、若しくはそれらの浸出液とペプトン、炭水化物の混合物、又は麦芽エキスを挙げることができる。一般に窒素源は0.01～5重量%、好ましくは0.1～3重量%の濃度とするのが良く、培地の初発pHは4.0～7.0が適当である。また、これらの培地を用いる場合には、通常10～33℃で、好ましくは、20～30℃において、2～30日培養を行うが培養方法としては、通気攪拌培養又は振盪培養等の通常の培養方法を挙げることができる。

これらの培養液中で不飽和脂肪酸の含有率と収率を向上させ糸状菌菌株の形態をパルプ状から(顆)粒状に制御するための炭素源濃度は、用いる糸状菌及び他の培地成分からの影響もあるため、

り、より環境に適合した粒形態の菌体が優先して生育してくる。よって十分に物理的ストレスを与える他の手段、例えば、ガラスビーズ、小麦等培養液中に障害となる物体が存在すれば、菌体は物理的ストレスを受けて粒状となる。

〔発明の効果〕

本発明に従うと、糸状菌脂肪酸中の不飽和脂肪酸の含有率及び含有量が著しく上昇し、また菌体形状は粒状乃至顆粒状となり、結着性が小さくなるため、培養槽内壁に付着しない上に均一な攪拌と酸素供給が容易となる。このため、集菌、洗浄、脱水、破砕等の後処理工程も容易に行うことができ、目的物の最終的な収率も向上するので工業的な不飽和脂肪酸含有脂質の製造方法として好適である。

実施例1 (物理的ストレスが小さい場合)

小麦餅1%、ポリペプトン(大五栄養化学調製)0.33%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 750 mg/lの組成にデキストロースを5%、10%、15%、20%、25%の各濃度となるように添加した培

一液には特定しないが、例えば、50 g/l以下の範囲を培養中期又は終了時付近まで維持し、不飽和脂肪酸の生産量を高める。

また物理的ストレス強度を上げるために、培地中に不溶固形物を含む組成、好ましくは、成長促進因子をも含む蜜を0.5～4%、好ましくは、1～2%用いることができる。

物理的ストレス強度は、通気攪拌培養を考える時、単位体積当りの所要動力を用いて表せる。糸状菌培養においては、培養液が非ニュートン流体であり、均一な粘度をもっておらず、また使用する菌株、培養時間(菌齢)により培養液の状態が種々変化するが、 $5.0 \times 10^0 \text{ Kg/m}^2 \cdot \text{sec}$ 以上、好ましくは $5.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^3 \text{ Kg/m}^2 \cdot \text{sec}$ とすることによって、モルティエラ属の糸状菌を粒状ないし顆粒状に形態を制御することが出来る。

単位体積当りの所要動力が菌体の受ける物理的ストレスを決定し、菌体にとって、そのストレスが上昇するとパルプ状の形態での生育は困難とな

地200mlを500ml坂口フラスコ中に調製した。一方、モルティエラ・アルビナ(ATCC 32221)をブドウ糖ペプトン培地(日水製薬社製)を用いた培地4ml中で6日間前培養し、それを上記各培地に植菌し、培養温度20℃、120rpmで往復振盪培養を20日間行った。同時に5%濃度の系で培養初期の10日間5%濃度を維持するよう、デキストロースを追加し、全20日間の培養を行ったパッチも検討した。

菌体は25%デキストロース濃度では殆んど増殖せず、10～20%デキストロース濃度では、パルプ状に増殖したが、5%デキストロース濃度では、粒状に増殖した。各菌体をガーゼにより集菌後、脱水・洗浄操作を2回ずつ繰り返し、小麦餅不溶部分を含む湿菌体を得た。この湿菌体をデシケータ中で減圧乾燥し、得られた乾燥菌体を実験室用粉碎ミル(シバタ科学社製)で粉碎し、クロロホルム/メタノール、2:1(v/v)により脂質を抽出した。次いで金属ナトリウムを用いたアルコリスにより脂質をメチルエステル化し、

脂質中の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで分析して全脂肪酸中のアラキドン酸含有率を求めた。結果を表1に示す。初発デキストロース濃度の低いほど、全脂肪酸中のアラキドン酸含有率は上昇し、5%デキストロースを用いた時の値は、20%デキストロースを用いた時のほぼ2倍であった。即ち、物理的ストレスが小さく菌体増殖が緩慢な場合でも、糖濃度が低いとアラキドン酸の脂肪酸中の含有率は向上する傾向を示している。又、低い糖濃度を保ちながらデキストロースを追加すると収率も向上することがわかる。

表 1

	デキストロース濃度 (%)	菌体形状	乾燥菌体 湿重 (g/ℓ)	メチル エステル量 (g/ℓ)	脂肪酸中の アラキドン酸 含有率 (%)	アラキドン酸 の収率 (g/ℓ)
本発明	5	ベレット状	18.9	5.80	54.5	3.16
	5 (10日間維持)	ベレット状	37.5	12.2	51.6	6.29
比較例1	10	バルブ状	26.0	8.05	44.2	3.56
	15	バルブ状	27.9	7.99	38.5	3.08
	20	バルブ状	17.9	1.43	28.9	0.41
	25	バルブ状	4.75	0.07	0	0

実施例2 (初発デキストロース濃度が高い場合)

小麦胚2%、デキストロース10%、ポリペプトン(大五栄化学工業)1%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 750mg/ℓからなる培養液を三連7ℓジャーフェーマンター(丸菱エンジニアリング社製MJ-N7×3型)に各4ℓずつ調製した。同一組成の培養液100mlを坂口フラスコに用意し、モルティエラ・アルビナ(ATCC32221)を4日間前培養したものを上記7ℓのジャーの各々に植菌し、培養温度20℃、通気量0.5vvm、単位体積当りの所要動力1.75、78、412 $\text{kg/m}^3 \cdot \text{sec}$ で培養した。16日後に集菌、洗浄し、実施例1と同様の操作により脂質分析を行った。得られた結果を表2に示す。所要動力の増加に伴い菌体形状は粒状から顆粒状となり、脂質分析値は、各項目とも著しく向上した。即ち、初発デキストロース濃度が高くとも物理的ストレスが高く、菌体増殖を活発に保つと急速にデキストロースが消費され、脂肪酸中のアラキドン酸の含有率が向上し、アラキドン酸の生産性も高くなった。

表 2

	単位体積当りの 所要動力 ($\text{kg/m}^3 \cdot \text{sec}$)	菌体形状	乾燥菌体 湿重 (g/ℓ)	メチル エステル量 (g/ℓ)	脂肪酸中の アラキドン酸 含有率 (%)	アラキドン酸 の収率 (g/ℓ)
比較例2	1.75	バルブ状	32.0	6.63	36.6	2.43
	78	粒状 (長さ <4mm)	39.2	12.4	47.5	5.89
本発明	412	顆粒状 (長さ <3mm)	46.2	14.9	71.1	10.6

実施例3 (残糖量とアラキドン酸生成量の関係)

実施例2と同様の培養液20ℓを30ℓタンク(小松川化工機社製マグネット攪拌型)に調製した。一方モルティエラ・アルピナ(ATCC 32221)を上記と同様の組成の培地1.5ℓに6日間培養し、それを30ℓタンクに誘導し、通気量0.5vvm、単位体積当りの所要動力 $3.0 \times 10^3 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{sec}$ 、培養温度20℃にて15日間培養を行い、内容物をサンプリング孔から経時的にサンプリングし、実施例1と同様の方法で脂質分析を行うと共に、培養液中のデキストロース濃度をグルコースBテスト(和光純薬社製)を用いて測定した。結果を表3に示す。

菌体形状は、培養6日目から長さ約3mmの(顆)粒状となった。残糖量は、培養開始直後から減少しはじめ、13日目で0となった。それに反比例し、菌体重量、総メチルエステル量は増加したが増殖非連動のアラキドン酸はやゝ遅れて増加しはじめ、デキストロース濃度が5%以下になった7日目頃から急激に収率が向上した。

表3

菌体形状	パルプ状	顆粒状	顆粒状	顆粒状	顆粒状	顆粒状
アラキドン酸の収率(g/g)	0.01	0.56	1.47	6.32	8.75	9.11
脂肪液中のアラキドン酸含有率(%)	3.78	22.4	30.2	44.2	53.0	65.1
メチルエステル量(g/g)	0.36	2.49	4.86	14.3	16.5	14.0
乾燥菌体重量(g/g)	11.4	32.3	40.2	42.4	44.4	41.4
残糖量(%)	9.8	6.8	5.6	0.8	0	0
培養日数	1	6	7	11	13	15

実施例4 (初発デキストロース濃度が高く、物理的ストレスが大きい場合)

実施例2と同様の培養液300ℓを500ℓタンク(小松川化工機社製)に調製した。一方モルティエラ・アルピナ(ATCC 32221)を上記と同様の組成の培地20ℓに4日間前培養し、それを500ℓタンクに誘導して植菌し、通気量0.5vvm、培養温度20℃、単位体積当りの所要動力 $1.1 \times 10^3 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{sec}$ で通気攪拌培養を16日間継続した。増殖した菌体は長さ約3mmの顆粒状で菌体相互の結着性は全くなく、培養槽内壁にも殆ど付着しなかった。直径5.5cmの遠心濾過機により集菌後水洗と遠心濾過(脱水)を各2回ずつ繰り返し、小麦粉不溶部分を含む湿菌体38.2kgを得た。この湿菌体をコロイドミル(増産産業製MKZ A-10-15型)で破砕後、ヘキサン-エタノールにより脂質を抽出した。次いで金属ナトリウムを用いたアルコリススにより脂質をメチルエステル化し、脂質中の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで分析して、全脂肪酸中

のアラキドン酸含有率を求めた。また同組成の培地5ℓを7ℓジャー(丸菱エンジニアリング社製型式MJ-N7×3)に調製し、モルティエラ・アルピナ(ATCC 32221)を通気量0.6vvm、培養温度20℃、単位体積当りの所要動力 $2.2 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{sec}$ で16日間培養したものを比較例3として行い、パルプ状の菌体を得た。種母は500ml坂口フラスコに100mlの同一培地を仕込んで4日間培養したものを用いた。

菌体形態が顆粒状の場合には均一な攪拌を容易に行うことができ、また脱水、破砕も濾布やコロイドミルの目づまりがなく非常に効果的に行うことができた。しかも、アラキドン酸の収率及び生産性もパルプ状形態の場合と比較して約3倍の好成績を示した。結果を表4にまとめて示す。

表 4

アラクシドンの収率 (g/g)	11.1	3.80
脂肪体中のアラクシドンの含有率 (%)	71.2	49.0
メチルエステル量 (g/g)	15.6	7.76
乾燥固体重量 (g/g)	48.9	37.5
固体形状	顆粒状	パルプ状
	本発明	比較例3

ついて行ったところ、坂口フラスコでもジャーでも粒状に成長し、物理的ストレスは菌形態に相關しなかった。

菌 株 名	寄託番号	粒 状
コニディオボラス・ヘテロスポラス	ATCC 12941	< 1 mm
エントモフトラ・イザベリナ	IFO 8308	< 1 mm
モルティエセラ・ナナ	IFO 8190	4 mm
モルティエセラ・ラマニアナ	IFO 8287	< 2 mm
モルティエセラ・ヴィナセア	IFO 6738	4 mm

実施例 6 (デキトローズ濃度が低く、物理的ストレスが障害物体による場合)

200 g のジャガイモを浸出した浸出液に 4 g のデキストローズ、200 mg のポリペプトン (大五栄養化学研製)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mg を加えて全体を蒸留水で 200 ml とした培養液 (pH 5.6) と、直径 3 mm のガラスビーズ 40 g を

実施例 5 (初発デキストローズ濃度が高く、高い物理的ストレスを与えた場合)

実施例 2 と同様の組成の培地を調製し、その 200 ml を 500 ml の坂口フラスコに入れ、下記 8 菌株を個々に接種して 20℃、120 rpm で振盪培養を 6 日間継続したところ、増殖した菌体は全てパルプ状であった。一方、実施例 2 と同様の条件下 (単位体積当たりの所要動力 $402 \text{ kg/m}^2 \cdot \text{sec}$) でジャー培養を 6 日間行ったところ、全て粒状に増殖した。

モルティエセラ・アルピナ	IFO 8568
モルティエセラ・バイニエリ	IFO 8569
モルティエセラ・エロンガタ	IFO 8570
モルティエセラ・エクシグア	IFO 8571
モルティエセラ・ハイグロフィラ	IFO 5941
モルティエセラ・ミスティッシマ	IFO 8573
モルティエセラ・ポリセファラ	IFO 6335
モルティエセラ・ヴァーティシラタ	IFO 8575

比較例 4

実施例 5 と同様の実験を下記の糸状菌 5 菌株に

500 ml の坂口フラスコに入れ、オートクレーブで 15 分間 120℃ で滅菌し、放冷後、モルティエセラ・エクシグア (IFO 8571) を白金耳量接種し、120℃、100 rpm で、往復振盪培養した。8 日後に粒状の菌体を集め、洗浄、ガラスビーズの回収をし、実施例 1 と同様の操作により、脂質分析を行った。比較としてガラスビーズを用いない場合も同時に検討した。その結果、全脂肪酸中のジホモアーリノレン酸の含有率が 11.2% から、ガラスビーズ添加により 18.8% へと向上した。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成8年(1996)7月9日

【公開番号】特開平2-142486

【公開日】平成2年(1990)5月31日

【年通号数】公開特許公報2-1425

【出願番号】特願昭63-297283

【国際特許分類第6版】

C12P 7/64 7432-4B

//(C12P 7/64

C12R 1:645)

手 続 補 正 書

7.4.13

平成 年 月 日

特許庁長官 高 島 章 殿



1.事件の表示 昭和63年特許願第297283号

2.発明の名称 不飽和脂肪酸含有脂質の製造方法

3.補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 (676) ライオン株式会社

4.代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

氏 名 (5985) 井理士 中 村 秘



5.補正命令の日付 自 発

6.補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄



7.補正の内容

(1) 明細書第14頁表2中、本発明の単位体積当りの所要動力 (kg/m³・sec)

の値“412”を“402”と訂正する。

(2) 同第21頁の表中、第2番目の菌株名“エントモフトラ・イザベリナ”を

“モルティエレラ・イザベリナ”と訂正する。